


Edimburgo, 21 de Mayo de 2015

Mgtr. José De Gracia
Departamento de Ambiente
Minera Panamá
E.S.D.

Estimado Mgtr. José De Gracia:

Solicito, a través de esta nota, se brinde apoyo a Juan Carlos Villarreal, panameño con cédula 9-215-92, actualmente empleado del Jardín Botánico de Edimburgo y desde Octubre curador del herbario de la Universidad de Laval, Canadá. El objetivo es realizar colecta de plantas en Minera Panamá, área de Donoso, Provincia de Colón del 2 al 30 de Agosto del 2015 y del 10 al 20 enero del 2016. Las colectas serán realizadas por el Dr. Villarreal y Mgtr. De Gracia. Se colectarán solamente las raíces coralinas de las *Zamias* en el área, no se necesita recolectar material de la planta, solamente 4 semillas en total, y los vouchers serán fotográficos. Los trabajos que se realizarán en esta área complementan el proyecto: Transferencia genómica entre cícadas y cianobacterias y genética de poblaciones de las cianobacterias. La información recabada aquí ayudará a conocer la diversidad genética de las bacterias asociadas a las plantas y promoverán la conservación de estas plantas de gran importancia evolutiva. Duplicados de las colectas de las raíces serán depositados en la Universidad de Panamá.

Agradeciendo la atención que se le brinde a esta solicitud, se despide, con toda su consideración.

Cordialmente

Dr. Juan Carlos Villarreal A.
Royal Botanic Garden Edinburgh, 20A Inverleith Row,
Edinburgh EH39 5LR, Edimburgo, Escocia, Reino Unido.

Diversidad genética de la gimnosperma endémica *Zamia pseudoparasitica* y sus simbiontes y consecuencias genómicas de la interacción simbiótica entre cicadófitas y cianobacterias

[1]Juan Carlos Villarreal
[1]Université Laval, Department of Biology, Québec, Canada
[1]Smithsonian Tropical Research Institute, Panama, Panama.

*1. Justificación:*

La transferencia de agua, nutrientes y ARN mensajero entre organismos en contacto próximo ha sido ampliamente reportado. [1]. Tranferencia horizontal de genes (THG) se refiere al intercambio genético de material sin reproducción sexual y es una característica fundamental de organismos procarióticos y eucarióticos [2,3,4]. Esa propuesta se enfoca en dos plantas que tienen asociaciones simbióticas con cianobacterias que fijan nitrógeno o también llamadas cianófitas o cianobacterias: antocerotes y cícadas del género Zamia. La simbiosis entre estos organismos es mutualística y las plantas obtienen nitrógeno en forma de amonio y las cianófitas los productos de la fotosíntesis del hospedero. Se conoce muy poco de la transferencia de genes entre ambos organismos y si existen un patrón de diversidad genética a nivel local o temporal. Con énfasis en plantas panameñas se responderán las siguientes preguntas:

1. Cual es el estado de diversidad genética de las cianófitas en la única gimnosperma epífita, *Zamia pseudoparasitica*?
2. ¿Existe transferencia genómica entre las cianófitas y plantas y cuáles genes se han transmitido horizontalmente?

.

*2.* Introducción*:*

Asociaciones simbióticas con cianobacterias evolucionaron hace 500 millones de años [5] y se encuentran en varios linajes de plantas como las cicadófitas (e.g *Zamia*), antocerotes, la angiosperma *Gunnera* y el helecho *Azolla* [6]. Estudios en antocerotes revela que el antocerote *Leiosporoceros dussii* contiene cianobacterias en canales elongados a través del talo. [7,8]. En cicadófitas, las cianobacterias se encuentran en una banda en raíces especializadas, llamadas raíces coraloides, y son abundantes en cada individuo. Las raíces se especializan en albergar el simbionte y por ende, son exclusivas para fijación de nitrógeno [6]. Las asociaciones con cianófitas al parecer son poco específicas pero no hay conocimiento de la diversidad genética en los trópicos. [9-11]. Las cianófitas viven en contacto íntimo con la planta y debido a ello, se supone que genes se han transferido horizontalmente. Esta investigación arrojará información sobre la transferencia genética entre los simbiontes usando secuenciación genómica de la planta con la cianófita, la cianófita crecida en cultivos axénicos y la zona de contacto. Además, se explorara la diversidad genética de las cianófitas usando el gen rbcLX. El trabajo se realizarán en Panama en el Instituto Smithsonian y en la Universidad Laval, Québec, Canadá, donde el científico encargado (Villarreal) ha sido nombrado recientemente profesor de sistemática de plantas. La investigación ampliará el conocimiento sobre las interacciones simbióticas en plantas y promoverá la investigación llevada a cabos por científicos panameños.

*3.* Objetivos de la investigación

1. Investigar la diversidad genética de las cianobacterias (cianófitas) en *Zamia pseudoparasitica*; al igual que la diversidad genética de la *Zamia* en el área de Donoso.
2. Estudiar el intercambio genòmico entre las cianobacterias en simbiosis con plantas

4. Metodología

*Zamia pseudoparasitica* es la única gimnosperma (relacionada a pinos y abetos) que tiene hábito epífito (crece sobre otras plantas) y es una planta endémica de la región central de Panamá. El hábitat de la especie está constante amenaza y no se conoce la diversidad genética de la especie, qué animales dispersan las semillas y el estado de la diversidad genética de la planta y sus cianobacterias asociadas a sus raíces. *Zamia pseudoparasitica* se ha colectado en El Copé, Santa Fé, Palo Seco y es muy abundante en el área de Donoso.

El estudio presente propone investigar la diversidad genética de las cianobacterias y de la *Zamia* y conocer su vecindario genético. Las colectas de la especie serán realizadas de árboles caídos, los cuáles serán mapeados y se recogerán muestras de las raíces (cerca de 4 $cm^2$), dos foliolos por planta y semillas cuando se encuentren plantas femeninas. Se realizará un estudio piloto utilizando cámaras para monitorear los dispersores de las semillas. Personas de las regiones donde crece *Z. pseudoparasitica* sugieren que la planta es dispersada por ardillas o tucanes, pero no existe evidencia contundente.

Adicionalmente, una o dos muestras serán utilizadas para estudios genómicos para investigar la transferencia de genes entre las plantas y las cianobacterias.

La información recabada durante esta investigación será esencial para establecer programas de conservación ex situ.

5. Literatura citada.


1. Kim, G., M.L. LeBlanc et al. 2014. Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts. *Science* 345: 808. DOI:10.1126/science.1253122.
2. Keeling, P.J. & J.D. Palmer. 2008. Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Review Genetics* 9:605–618.
3. Li, F.-W., J.C. Villarreal et al.. 2014. Horizontal gene transfer of a chimeric photoreceptor, neochrome, from bryophytes to ferns. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 111: 6672–6677, DOI: 10.1073/pnas.1319929111.
4. Fuentes, I., S. Stegemann et al. 2014. Horizontal genome transfer as an asexual path to the formation of new species. *Nature* 511: 232–235.
5. Raven, J. A. 2002. Evolution of Cyanobacterial Symbioses. In A. N. Rai,B. Bergman, And U. Rasmussen [Eds], In *Symbiosis*, 329–346. Kluwer

Academic, Dordrecht, Netherlands.

6. Adams, D. G. 2000. Symbiotic Interactions. In B. A. Whitton And M. Potts [Eds.], *Ecology Of Cyanobacteria: Their Diversity In Time And Space*, 523–561. Kluwer Academic, Dordrecht, Netherlands.
7. Villarreal, J.C. & K.S. Renzaglia. 2006. Structure And Development Of *Nostoc* Strands In *Leiosporoceros dussii* (Anthocerotophyta): A Novel Symbiosis In Land Plants. *American Journal Of Botany* 93: 693-705.
8. Krings, M., H. Hass, H. Kerp, T. N. Taylor, R. Agerer & N. Dotzler. 2009. Endophytic Cyanobacteria In A 400-Million-Yr-Old Land Plant: A Scenario For The Origin Of A Symbiosis? *Review Of Palaeobotany And Palynology* 153: 62-69.
9. Ran, L., J. Larsson, T. Vigil-Stenman, J. Nylander, K. Ininbergs et al. 2010. Genome Erosion In A Nitrogen-Fixing Vertically Transmitted Endosymbiotic Multicellular Cyanobacterium. *Plos One* 5(7): E11486. Doi:10.1371/Journal.Pone.0011486
10. Meeks, J.C. 2003. Symbiotic interactions between *Nostoc punctiforme*, a multicellular cyanobacterium, and the hornwort *Anthoceros punctatus*. *Symbiosis* 34: 55-71.
11. Campbell, E.L., H. Christman & J.C. Meeks. 2008. DNA Microarray Comparisons of Plant Factor- and Nitrogen Deprivation-Induced Hormogonia Reveal Decision-MakingTranscriptional Regulation Patterns in *Nostoc punctiforme*. *Journal of Bacteriology* 190: 7382-7391.



**Universidad de Panamá, Facultad de Ciencias Naturales Exactas y Tecnología, Escuela de Biología, Departamento de Botánica**
**Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales, Laboratorios NAOS.**

Panamá, 26 de febrero de 2016

Informe de Colecta
Estimada M.Sc. Blanca Arauz,

El objetivo de la presente carta es rendir un informe de las muestras botánicas colectadas durante la gira realiza los días 22 al 26 de febrero de 2016 en el área del Proyecto Mina de Cobre Panamá de Minera Panamá S.A en Donoso, Colon; en base al proyecto en ejecución del Dr. Juan Carlos Villarreal "Diversidad genética de la gimnosperma endémica *Zamia pseudoparasitica* y sus simbiontes y consecuencias genómicas de la interacción simbiótica entre cicadófitas y cianobacterias" que lleva a cabo en conjunto con la Universidad de Laval (Canadá) y el Instituto Smithsonian de Investigaciones Tropicales (STRI), con el apoyo en sito de Minera Panamá S.A.

El día 23 de febrero en el área de Costal Road km 19 + 700 (8°53'24.8" N, 80°38'42.5" W), se colectaron 10 muestras de *Zamia pseudoparasitica* J.Yates. de las cuales seis ya estaban en el suelo y cuatro fueron colectadas de los árboles. El día 24 de febrero se colectaron 8 muestras de *Z. pseudoparasitica* J.Yates en el área de Presa Este, en dicho lugar todas las muestras fueron colectadas de los árboles.

En total se colectaron 18 plantas, a cada una se le realizo un váucher para ser depositado en el Herbario de la Universidad de Panamá. El resto de las muestras fueron procesadas de la siguiente manera, se tomó: 20 muestras de raíces coralinas para realizar extracciones de ADN (± 0.100 mg c/u), 6 muestras de raíces coralinas para realizar microscopia electrónica de barrido (± 10 g c/u), 10 muestras de raíces coralinas para realizar microscopia de luz y confocal (± 10 g c/u), 5 muestras de raíces coralinas (± 10 g c/u) y de hojas (± 5 foliolos c/muestra) para realizar cultivos de hongos endófitos, 5 muestras de raíces coralinas para realizar cultivos de cianobacterias (± 10 g c/u) y 4 muestras de raíces coralinas para realizar extracciones de ARN (± 50 g c/u). A cada una de las plantas se le realizo un váucher de foliolos en gel de sílice para futuros estudios de genética poblacional dentro del género *Zamia* en Panamá.

Los 18 rizomas de las plantas colectadas serán depositados en el Jardín Internacional de Cícadas de la Universidad de Panamá, para su conservación y evitar la pérdida del material genético de las plantas colectadas.

Se le agradece mucho todo el apoyo brindado durante la gira, se despide de usted.
Atentamente,
Maycol E. Madrid C.
Estudiante de Licenciatura
Pasante en STRI del Dr. Juan Carlos Villarreal.

| REPUBLICA DE PANAMA | MINISTERIO DE AMBIENTE<br>Apartado C, Zona 0843, Balboa, Ancón, Panamá<br>Albrook, Calle Diego Domínguez, Edificio 804<br>www.miambiente.gob.pa | **PERMISO CIENTÍFICO**<br>SCIENTIFIC PERMIT<br>No. SE/PB-1-16<br>VALIDO HASTA: 02-08-2016<br>VALID UNTIL<br>FAUNA / FLORA / HONGOS / BACTERIAS / OTROS ORGANISMOS<br>**FLORA y BACTERIAS** |
|---|---|---|

| INVESTIGADOR RESPONSABLE<br>MAIN RESEARCHER<br>Juan Carlos Villarreal | IDENTIFICACION<br>I.D.<br>9-215-92 - Panamá | COLECTA / COLLECT — OBSERVACION / OBSERVATION<br>MARCADO / MARKING — OTROS / OTHERS |
|---|---|---|
| ASISTENTE (S)<br>ASSISTANT (S)<br>Maycol Madrid | IDENTIFICACION<br>I.D.<br>8-871-2019- Panamá | **ESPECIAL**<br>**(Colecta y Observación)** |

INSTITUCION QUE RESPALDA LA INVESTIGACION
INSTITUTE SUPPORTING THE RESEARCH
Instituto Smithsonian de Investigaciones tropicales

| OBJETIVO<br>PURPOSE<br>Investigar la diversidad genética de las cianobacterias (cianófitas) en antocerotes y zamias.<br>TITULO DEL PROYECTO: Intercambio genómico entre cianofitas y plantas y su diversidad genética. | LUGAR DEL ESTUDIO<br>STUDY<br>PN Santa fé, Valle de Antón, MN Cerro Gaital, PNGDOTH, Chiriquí Grande, RF Fortuna, Donoso. **NO INCLUYE AREAS QUE NO CUENTEN CON CONSENTIMIENTO LIBRE INFORMADO PREVIO, APROBADOS POR EL MINISTERIO DE AMBIENTE, TAMPOCO INCLUYE AREAS DE CONCESION MINERA** |
|---|---|

| NOMBRE COMUN<br>COMMON NAME | NOMBRE CIENTÍFICO<br>SCIENTIFIC NAME | CANTIDAD<br>QUANTITY | DESCRIPCIÓN<br>DESCRIPTION |
|---|---|---|---|
| Antocerote | *Leiosporoceros dussii* | 10 muestras | Cada muestra de 5 $cm^2$ |
| Antocerote | *Anthoceros tuberculatus* | 10 muestras | Cada muestra de 5 $cm^2$ |
| Zamia | *Zamia nana* | 40 muestras de raíz coralina y 4 semillas | 5-10 $cm^2$ c/u y 4 semillas |
| Zamia | *Zamia pseudoparasitica* | 50 muestras de raíz coralina y 4 semillas | 5-10 $cm^2$ c/u y 4 semillas |

DURACION DEL ESTUDIO
TIME OF STUDY
01-02-2016 Hasta 01-08-2016

ESTE PERMISO ES EMITIDO POR:
THIS PERMIT IS ISSUED BY:

Dirección de
Áreas Protegidas
y Vida Silvestre

FECHA:
DATE 02-02-2016

Elaborado por Anthony Vega

Vo Bo Jorge U. García

LIC. SAMUEL VALDÉS DÍAZ
Director de Áreas Protegidas y Vida Silvestre

FIRMA RESPONSABLE Y SELLO

TODO INVERSTIGADOR DEBE: 1. REPORTARSE A LA REGION CORRESPONDIENTE ANTES DE INICIAR SU TRABAJO; 2. PORTAR EN TODO MOMENTO EL PERMISO CORRESPONDIENTE; 3. ENVIAR INFORME DE COLECTA A LA ANAM; 4. ENTREGAR MUESTRAS DE CADA ESPECIE A LA UNIVERSIDAD DE PANAMA; 5. ENVIAR A LA ANAM, A MAS TARDAR EN UN AÑO, AVANCE O INFORME FINAL DEL ESTUDIO, CON RESUMEN EN ESPAÑOL DE LO CONTRARIO NO SE LE OTORGARA OTRO PERMISO.

EVERY RESEARCHER MUST: 1. REPORT TO THE NEAREST ANAM OFFICE BEFORE START WORKING, 2. CARRY THE PERMIT AT ALL TIMES; 2. SEND A REPORT OF COLLECTED MATERIAL TO ANAM; 4. SEND SAMPLES OF REPRESENTATIVE MATERIAL TO [illegible] INTERMEDIATE OR FINAL REPORT TO ANAM WITHIN A YEAR, WITH A SPANISH SUMMARY.
NO MORE PERMITS WILL BE ISSUED TO THOSE WHO DO NOT COMPLY WITH THESE REGULATIONS.

**STRI WARNS YOU OF THE FOLLOWING:** Under no circumstances, should samples collected under the terms and conditions of this permit be used in research that pursues economical or commercial benefits of any kind, or for any other goal not academic in nature or not oriented towards t